

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591979

研究課題名(和文)肝内胆管癌における肝内リンパ管侵襲機序の解明

研究課題名(英文)An analysis of intrahepatic lymphatic invasion in the patient with intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

打波 宇(Uchinami, Hiroshi)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40400486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肝癌の約5%を占める肝内胆管癌には手術が根治を期待できる唯一の治療であるが、切除後の予後は極めて不良である。いくつかの予後不良因子が報告されているが、特にリンパ節転移の有無は治療成績に大きな影響を与える。このことから、術前にリンパ節転移が明らかな症例に対する手術適応や、手術時のリンパ節郭清の意義など、未だに一定の見解が得られていない。よって肝内胆管癌におけるリンパ節転移の機序解明は治療戦略の立案には極めて重要と考えられる。今回、肝内胆管癌症例の切除標本を用いて、肝内リンパ管侵襲がリンパ節転移におよぼす影響を解析した。また、肝内胆管癌の根治切除にはリンパ節郭清が必須である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) arising from the intrahepatic bile duct is the second most frequent hepatic malignancy. Lymph node metastasis is known to be one of strong prognostic factors for survival in the patients undergoing curative resection for ICC. Therefore, the value of lymph node dissection during surgical treatment for ICC or indication of the resection for the patients who are preoperatively diagnosed to have metastatic lymph nodes is still in debate. In this study, we evaluated correlation between intrahepatic lymph vessel invasion and lymph node metastasis. We also investigated the outcomes of ICC patients following curative resection to analyze the influences of lymph node dissection on survival and recurrence.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝内胆管癌 リンパ節転移 リンパ節郭清 肝切除

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は原発性肝癌の約 5% を占める比較的稀な悪性腫瘍であるが、近年増加傾向にある。根治性のある治療法は外科的切除のみである。しかし、リンパ節転移を伴う場合は非常に予後不良であり、日本肝癌研究会による追跡調査でも 5 年生存率は約 15% である。その原因として、定型的なリンパ節郭清が、複雑に交錯した肝内および肝周囲のリンパ流に対して効果を発揮しないためと推測されている。つまり、縦隔や後腹膜につながるリンパ管を介した全身リンパ節転移が存在しているため、肝臓周囲のリンパ節のみ一生懸命切除したとしても予後の改善につながらないと考えられているのである。このことから肝内胆管癌の外科的治療におけるリンパ節郭清の意義についても意見が二分している。このように、予後不良な肝内胆管癌の治療は、「根治性が望まれるのは手術のみ」とされているものの、手術術式でさえもいまだ確立していない。このような現状のままでは手術のみで肝内胆管癌の成績向上は期待できない。

一方、大腸癌は消化器癌の中で肝転移を来しやすい癌腫である。原発巣にいたっては所属リンパ節転移が高率におこるため、治療に際して原発巣切除およびリンパ節郭清が行われる。しかし、肝転移症例において、転移巣を介した肝周囲のリンパ節転移は約 3% と稀であり、リンパ節郭清を伴わない肝切除でも 5 年生存率は 30 - 50% と成績は良好である。また、肝細胞癌は門脈、肝静脈といった血管浸潤を容易に来すものの、リンパ節転移は非常に稀であり、外科的切除の際にリンパ節郭清は不要であることはコンセンサスが得られている。このように、肝悪性腫瘍でも肝からのリンパ流を介したリンパ節転移においてこれだけの違いがあるのは、肝組織中リンパ管への侵襲に必要な特性を肝内胆管癌細胞のみが有している可能性がある。

最近我々は代表的な原発性肝癌である肝細胞癌症例において、癌細胞自身が内因性阻害因子を発現する事を明らかにした(Ann Surg Oncol. 2009 Oct; 16(10): 2805-17)。脈管侵襲に対する作用までは明らかに出来なかったが、胆管細胞癌症例では Bikunin の発現を認めておらず、同じ原発性肝癌でも癌種によって浸潤に関連する分子の発現パターンが異なっていることが確認された。この結果から、肝内胆管癌細胞のみが肝内リンパ管に対する強い親和性を持つ分子を発現し、リンパ管侵襲の原因になっている可能性があると考えられる。

肝内胆管癌はリンパ節転移のみならず、肝内転移も好発するため、肝内胆管癌に対する外科治療にはなるべく多くの肝実質を切除するとともに、リンパ節郭清、さらには浸潤した門脈や肝動脈の合併切除再建を行うべきとする報告も多く見受けられる。それに伴い、手術侵襲や術後合併症の発生頻度も高く

なり、術後不可逆的な肝不全を誘発しうる結果となる。肝切除術の安全性向上は肝内胆管癌の治療成績の改善に貢献しうると考えられる。

2. 研究の目的

肝内胆管癌の予後を強力に規定するリンパ節転移の機序を解明とリンパ節郭清の意義を評価することによって、肝内胆管癌の治療成績の向上および治療体系の確立を目指し、本研究を立案した。また、術後肝再生不良や肝不全といった、致命的な合併症を防止する治療戦略の確立も目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆管癌症例のデータベース構築

2003 年から 2012 年までの当科で行った肝内胆管癌根治切除症例の性・年齢・部位・ステージ・分化度・リンパ節転移の有無・肝内転移の有無などを網羅したデータベースを構築し、治療成績の解析を行うための準備を行った。

(2) 切除標本における肝内リンパ管侵襲評価

切除標本を用いて、肝内胆管癌における肝内リンパ管侵襲の有無とその程度を詳細に検討し、リンパ節転移との関連性を評価した。

(3) 術前画像診断能力の検討

切除症例の術前 CT 画像を再度詳細に検討し、術前のリンパ節転移と疑われた所見と実際のリンパ節転移の有無を比較し、術前にリンパ節転移の診断が可能かどうかを検討した。

(4) リンパ管侵襲に関連する分子の同定

肝臓におけるリンパ節転移を来しにくい他癌腫と比較して、マトリックスメタロプロテアーゼ、内因性阻害分子、接着分子、ケモカインといった、癌細胞の浸潤能に関連する分子の発現と局在を比較検討し、肝内胆管癌が特異性を解明するために免疫染色を行う。

(5) 肝幹細胞を用いた肝保護法の確立

残肝体積の増加を図る目的として、門脈塞栓術は有効な手段である。以前、我々は塞栓薬に肝幹細胞の 1 つである肝上皮性細胞 (LEC) が誘導されることを報告した。他の間葉系幹細胞が細胞保護効果を有することから、この LEC も肝細胞に保護的に機能すると考え、実験を行った。

(6) 転写因子を利用した肝虚血再灌流障害の制御

元来、生体が有する抗酸化遺伝子群を制御する転写因子を活性化させることで肝虚血再灌流障害を軽減させることが可能か検討した。

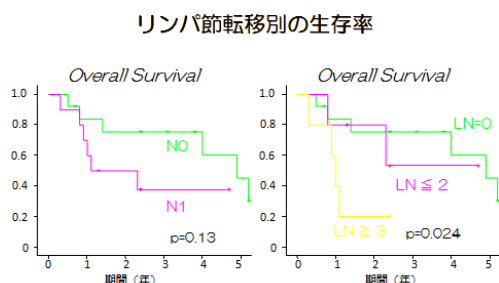
4. 研究成果

(1) 末梢型肝内胆管癌症例の検討

2003 年から 2012 年の間、23 例の末梢型肝内胆管癌に根治切除が行われた。23 例中 17 例に肝葉切除以上が行われた。リンパ節郭清は術前診断が肝細胞癌および転移性肝癌の 2

例を除く 21 例に行い、主腫瘍の局在が右葉であれば、No.8, No.12, No.13, No.16 リンパ節を、左葉であれば以上に加えて No.1, NO.3 リンパ節を郭清した。リンパ節転移陽性症例は 23 例中 10 例に認めた。23 例の 5 年生存率は 36.7%であった。

リンパ節転移別の 5 年生存率を下図に示す。



Log-rank test ではリンパ節転移陽性例では予後不良な傾向を認めたが、統計学上の有意差は認められなかった。そこで、転移個数別に比較したところ、転移リンパ節 3 個以上では有意に切除成績不良であった。そこで、術前画像によりリンパ節転移の診断が可能か否かを検討した。短径 1.0cm 以上のリンパ節を転移陽性と判断したところ、感度 40%、特異度 61.5%、正診率 52.2%であり、術前の正確なリンパ節転移の診断は困難であると思われた。

また、リンパ節転移のみならず、肝内転移陽性症例の 5 年生存率も有意に不良であり、肝内転移の有無も治療成績に影響を与える因子であった。

(2) 肝内リンパ管浸潤の検討

肝内リンパ管浸潤の評価が可能であった 15 例を検討したところ、リンパ節転移の有無にかかわらず、すべての症例で浸潤ありと診断された。リンパ管浸潤の程度を弱 (ly1)・中 (ly2)・強 (ly3) に分類したところ、ly1 の 6 例中 3 例、ly2 の 6 例中 2 例、ly3 の 3 例全例でリンパ節転移陽性であり、リンパ管浸潤が極めて軽度であってもリンパ節転移は起こりうる結果であった。また、ly3 症例すべて転移個数が 3 個以上であったことから、肝内胆管癌のリンパ管への高い親和性を示す結果と考えられた。さらに肝内胆管癌の浸潤性を明らかにすべく、マトリックスメタロプロテアーゼ、内因性阻害分子、接着分子、ケモカインといった、癌細胞の浸潤能に与える分子の免疫染色を用いて検討する予定であったが、種々の抗体の最適な染色条件の設定に難渋しており、specific な発現と断定できる結果が出せず、本研究期間内に一定の結果を出すことは出来なかった。

以上の結果から、リンパ節転移の有無を術前に診断できない現状では、手術適応の決定は容易でないこと、さらに例えリンパ節転移

があったとしても転移個数が少なければ根治が期待できることから、肝内胆管癌に対しては解剖学的に切除可能であれば、広範囲リンパ節郭清を伴う積極的な切除が望ましいと思われる、主要学会において発表するとともに論文作成中である。

(3) 拡大肝切除のさらなる安全性の追求

門脈塞栓症に出現する LEC を分離し、低酸素下に培養した後、細胞生存率をトリパンブルー染色および MTT 法で評価したところ、肝細胞が生存できない 2% 酸素下でも LEC の生存率はほぼ 100% であった。低酸素耐性の機序を明らかにすべく、転写因子 HIF-1 の活性化を評価してみると、LEC では低酸素によって HIF-1 が速やかに活性化していた。また、HIF-1 標的遺伝子で、pyruvate dehydrogenase を阻害し、アセチル CoA 以下の呼吸鎖を抑制することで、ミトコンドリア電子伝達系での酸素消費と活性酸素発生を抑える PDK-1 の発現が増強しており、低酸素下でも LEC 内の ATP 量は維持されていた。次に肝細胞に対する保護作用を有するか否かを検討するために、ケモカインの 1 つである SDF-1 に着目してみると、LEC は常時 SDF-1 を発現していた。一方、肝細胞では低酸素により SDF-1 のレセプター、CXCR-4 の発現が増強していた。そこで、組み替え SDF-1 で肝細胞を刺激すると、低酸素下での肝細胞生存率が有意に向上した。さらに LEC conditioned medium で肝細胞を刺激しても組み替え SDF-1 と同様、低酸素における肝細胞の生存率を向上させた。LEC conditioned medium の保護効果が CXCR4 アンタゴニストによって打ち消されたことから、LEC は肝細胞と共存する場合には低酸素下で自分も生存しながら SDF-1 を分泌することによって、肝細胞を低酸素から保護していることが明らかとなった。LEC の肝細胞保護効果を *in vivo* で確認するため、門脈本幹結紮および脾臓皮下固着モデルを作成、この状態で出血性ショックおよび肝虚血再灌流を行ってみると、LEC が誘導されていない脾臓皮下固着モデルに比し、有意に血中 AST/ALT 値の上昇は抑制されていた。

以上から、門脈塞栓によって誘導される LEC が肝保護作用を有することが明らかとなった。

次に、内因性抗酸化物質の発現を制御する転写因子 Nrf2 の肝虚血再灌流障害に対する働きを評価すべく、Nrf2 ノックアウトマウスを用いて、肝虚血再灌流障害を行ってみたところ、ワイルドタイプマウスに比べ Nrf2 ノックアウトマウスでは AST/ALT が有意に増加しており、組織学的にも壊死巣が広範に認められた。Nrf2 活性化作用を有する薬剤、プロスタグランジン J2 をワイルドタイプマウスおよび Nrf2 ノックアウトマウスに投与し、同様の実験を行ってみると、ワイルドタイプマウスではプロスタグランジン J2 投与によって、AST/ALT 上昇および肝壊死は有意に抑

制されたが、Nrf2 ノックアウトマウスではプロスタグランジン J2 の保護効果は認められなかった。これらの結果は Nrf2 が肝虚血再灌流障害に対して抑制的に働くこと、さらに虚血前の Nrf2 活性化は障害に対する保護作用を有することを示唆している。そこで Nrf2 の保護機構を詳細に検討すべく、抗酸化遺伝子群の発現を評価したところ、Nrf2 標的遺伝子である GSTm1, NQO1, GCLc の発現がプロスタグランジン J2 投与により増加しており、再灌流後の GSH/ GSSG 比低下、過酸化脂質 Malondialdehyde 上昇、TNF- α 上昇が抑制されていた。この結果は Nrf2 が活性化することによって誘導された抗酸化遺伝子が酸化障害に対して抑制的に働き、肝臓を肝虚血再灌流障害から保護していると考えられた。

これらの結果は肝切除の安全性向上に寄与しうる貴重なデータであると思われ、主要学会および論文で発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kudoh K, Uchinami H, Yoshioka M, Seki E, Yamamoto Y:

Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice.

Ann Surg. 査読有、260 (1): 118-127, 2014

2. Yoshioka M, Watanabe G, Uchinami H, Miyazawa H, Abe Y, Ishiyama K, Hashimoto M, Nakamura A, Yamamoto Y:

Diffusion-Weighted MRI for differential diagnosis in gallbladder lesions with special reference to ADC cut-off value. Hepatogastroenterology, 査読有、60 (124), 692-698, 2013

3. Watanabe G, Uchinami H, Yoshioka M, Nanjo H, Yamamoto Y:

Prognosis analysis of sarcomatous intrahepatic cholangio- carcinoma from a view of the literature.

Int J Clin Oncol. 査読有、2013, 10.1007/s10147-013-0586-x

4. Abe Y, Uchinami H, Kudoh K, Nakagawa Y, Ise N, Watanabe G, Sato T, Seki E, Yamamoto Y:

Liver epithelial cells proliferate under hypoxia and protect the liver from ischemic injury via expression of HIF-1 alpha target genes.

Surgery. 査読有、152 (5), 869-878, 2012

5. Nakagawa Y, Yoshioka M, Abe Y, Uchinami H, Ohba T, Ono K, Yamamoto Y:

Enhancement of liver regeneration by adenosine triphosphate-sensitive K-channel opener (diazoxide) after partial hepatectomy.

Transplantation. 査読有、93 (11), 1094-1100, 2012

6. Watanabe G, Uchinami H, Yoshioka M, Abe Y, Kikuchi I, Iwasaki W, Kume M, Yamamoto Y:

Transfection of naked nuclear factor-kB decoy oligodeoxynucleotides into liver by rapid portal vein infusion in rats: its effect on ischemia-reperfusion injury of liver.

Hum Gene Ther. 査読有、23 (4), 428-436, 2012

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 打波 宇、吉岡政人、渡辺 剛、阿部ゆき、山本雄造:胆管細胞癌の治療成績 - 胆管細胞癌切除例からみたリンパ節郭清の意義と補助化学療法の効果 .

第 25 回日本肝胆膵外科学会学術集会、栃木、2013 年 6 月 12 - 14 日

2. 打波 宇、渡辺 剛、吉岡政人、阿部ゆき、高橋智和、安藤秀明、山本雄造:肝内胆管癌切除例からみた治療戦略の検討 .

第 67 回日本消化器外科学会総会、富山、2012 年 7 月 18-20 日

3. 工藤和夫、打波 宇、山本雄造:肝虚血再灌流障害に対し Nrf2 は保護的に働く .

第 67 回日本消化器外科学会総会、富山、2012 年 7 月 18-20 日

4. 打波 宇、阿部ゆき、渡辺 剛、吉岡政人、山本雄造:右側肝門索を伴った肝内胆管癌に対する肝左 3 区域切除 .

第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会、大阪、2012 年 5 月 30 日 - 6 月 1 日

5. 打波 宇、吉岡政人、渡辺 剛、阿部ゆき、高橋智和、安藤秀明、山本雄造:中下部胆管癌切除症例の再発形式からみた至適リンパ節郭清範囲の検討 .

第 112 回日本外科学会定期学術首魁、千葉、2012 年 4 月 12-14 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

打波 宇 (UCHINAMI, Hiroshi)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40400486

(2)研究分担者

山本雄造 (YAMAMOTO, Yuzo)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70281730